Acyl-ACPs 的规模化合成

丁威 [1,2*]，冯延宾 [1*]，曹旭鹏 [1]，薛松 [1**]
（1．中国科学院大连化学物理研究所，海洋生物工程组，辽宁大连，116023；
2．中国科学院大学，北京 100049）

摘要： 脂酰-酰基载体蛋白（fatty acyl-acyl carrier protein, acyl-ACP）是多种生物合成途径中的酰基供体。因供给限制，体外研究常用类似物 acyl-CoA 替代，而 CoA 部分和 ACP 有较大差异，限制了相关酶对底物识别的认识。因此稳定获得大量 acyl-ACP 是体外研究相关酶的催化机制及其代谢途径的关键。研究以 *holo*-ACP 和 C4-C18 链长脂肪酸为底物，在哈氏弧菌 acyl-ACP 合成酶（*Vibrio harveyi* acyl-ACP synthetase, VhAasS）催化下合成不同碳链长度的 acyl-ACP；通过高效液相色谱(HPLC)方法，确定不同碳链长度 acyl-ACP 的合成产率。结果表明：碳链为 C4-C14 的 acyl-ACP 产率均高于 90.0%，16:0-ACP 产率为 85.9%，18:1-ACP 产率仅为 25.7%。通过加入 Li^+优化反应体系，16:0-ACP、18:1-ACP 的产率达 90.0%。进一步优化扩大反应体系可稳定获得 20 mg 以上 acyl-ACP；最后，把合成的 acyl-ACP 应用到甘油-3-磷酸酰基转移酶催化的反应体系中。不同链长 acyl-ACP 的规模化合成研究，为体外研究相关酶的催化机制提供重要基础。

关键词：acyl-ACP 合成酶，acyl-ACP，HPLC

酰基载体蛋白（acyl carrier protein，ACP）在生物体内负责将脂酰基团转移至目标底物形成酰基化物，是脂肪酸[1]、磷脂[2]、聚酮类抗生素[3]、类脂 A[4]等生物合成途径中酰基的重要载体。细胞合成的 ACP 即 *apo*-ACP，通常由 70-80 个氨基酸残基构成[5]，含有一个高度保守丝氨酸（Ser）结构域（D–S–L）。*Apo*-ACP 中 Ser 残基的羟基通过磷脂键连接来自辅酶 A 的 4’-磷酸泛酰巯基乙胺基团后，成为活性 ACP 形式 *holo*-ACP[6]。脂酰基通过硫酯键与 *holo*-ACP 中磷酸泛酰巯基乙胺末端巯基结合形成 acyl-ACP[7]。

Acyl-ACP 是生物代谢过程多种酶的必须底物（表 1），而目前尚无商品化的 acyl-ACP[8]，且体内游离的 acyl-ACP 很少[7]，很难直接分离得到特定链长的 acyl-ACP。因此，在体外高效稳定合成 acyl-ACP 对研究相关酶的催化机制具有重要意义。

国家自然科学基金项目 No. 21576253, No. 21708040 资助

*共同第一作者

**通讯作者：xuesong@dicp.ac.cn

表 1 以 acyl-ACP 为底物的酶

Table 1 Enzymes using acyl-ACP as substrates

酶	参与的反应和代谢过程	参考文献
硫酯酶	催化不同链长 acyl-ACP 水解；参与脂肪酸、聚酮类抗生素合成；	[1]
脂肪酸去饱和酶	催化 acyl-ACP 去饱和；参与不饱和脂肪酸合成；	[9]
甘油-3-磷酸酰基转移酶	催化 acyl-ACP 和甘油-3-磷酸反应，生成 LPA；参与磷脂合成；	[2]
聚酮合酶	催化酮脂酰 ACP 缩合；参与聚酮类抗生素的合成；	[3]
UDP-氨基葡萄糖乙酸酐酰基转移酶	催化β-羟肉豆蔻酸和 UDP-氨基葡萄糖乙酸酐，生成 UDP-3-单酰氨基葡萄糖乙酸酐；参与类脂 A 的合成；	[4]

Acyl-ACP 体外合成以 *holo*-ACP 和脂肪酸为底物，由 acyl-ACP 合成酶（acyl-ACP synthetases，AaaSs）催化完成（图 1）。目前已有研究的 AasS 分别来源于哈氏弧菌（*Vibrio harveyi*）[10]、大肠杆菌（*Escherichia coli*）[11]、黏红酵母（*Rhodotorula glutinis*）[12]、集胞藻 6803（*Synechocystis sp. PCC 6803*）[13]、聚球藻 7942（*Synechococcus elongatus PCC 7942*）[14]。大肠杆菌 AasS 在体外不稳定[10,15]，黏红酵母 AasS[12]是酶复合体，均难于获得；而哈氏弧菌 AasS (VhAasS) 易于纯化，活性较高，因此应用前景较大。Acyl-ACP 的合成和定量一般以放射性同位素标记的脂肪酸为底物，在微量体系下进行[10]，而同位素标记所用 ^{14}C 较为昂贵，控制严格。因此，开发高效简易的 acyl-ACP 合成及定量方法尤为重要。

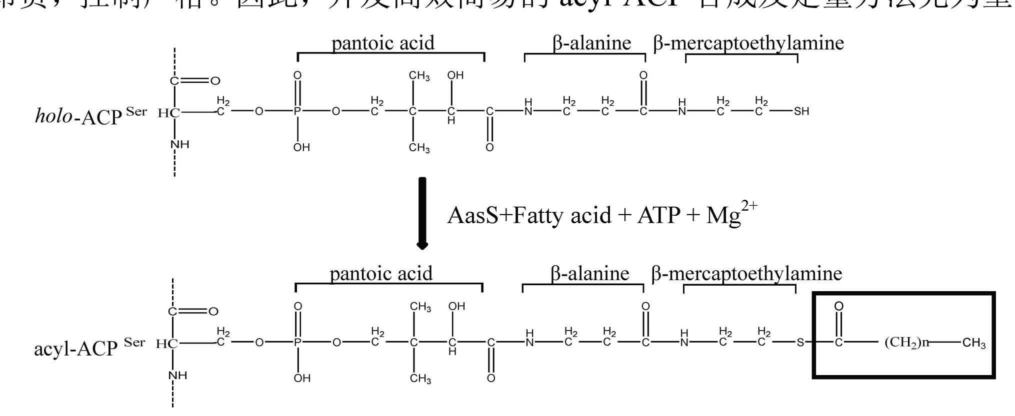


图 1 Acyl-ACP 的合成方法

Fig1 Synthesis of acyl-ACP using acyl-ACP synthetase

本研究以哈氏弧菌 AasS 催化 acyl-ACP 合成方法（图 1）为基础，建立基于 HPLC 的 acyl-ACP 定量方法，优化反应参数，极大地提高 acyl-ACP 合成效率，并大规模制备出不同种属来源高纯度的 acyl-ACP，为以其为底物的代谢途径研究提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

pET-28a(+)-ACP、pET-28a(+)-AasS 质粒由本实验室收存。硫酸卡那霉素、三磷酸腺苷（ATP）、牛血清白蛋白（BSA）购自上海生工生物工程公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）购自大连 TaKaRa 公司；二硫苏糖醇（DTT）购自 INALCO 公司；苯甲基磺酰氟（PMSF） 购自 Amresco 公司；蛋白质浓度测定试剂盒购自 Bio-Rad 公司；乙腈购自 Merck 公司；三氟乙酸（TFA）、脂肪酸（FA）、甘油-3-磷酸（G-3-P）、溶血磷脂酸（LPA）购自 Sigma 公司；其它化学试剂均为分析纯。LB 培养基组成为：10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母浸粉，10 g/L NaCl，pH 7.2。

1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌、集胞藻 6803 *holo*–ACP 的表达纯化

将质粒 pET-28a(+)-ACP 转化到大肠杆菌 *BAP1* 菌株[16]中，挑取单菌落，接种于 100 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养液中，37 ℃振荡过夜培养。取 8 mL 过夜培养液接种于新鲜的 800 mL LB（含 50 mg/L 卡那霉素）中，37 ℃振荡培养至 OD_{600} 约为 0.8 后，添加终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h，6500 rpm 离心 15 min 收集菌体，目的蛋白的纯化在 4 ℃或冰上进行以以下步骤进行。

细胞裂解：使用 100 mL Lysis Buffer 重悬 3 g 菌体，加入 100 μL β-ME，和终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF，超声裂解细胞，12000 rpm 离心 30 min，收集上清。

Ni–NTA 亲和层析：先用 Equilibrate Buffer 平衡镍柱，再将收集的上清缓慢流过镍柱，然后用 Wash Buffer 洗脱杂蛋白约 4 个柱体积，最后用 Elute Buffer 洗脱并收集目的蛋白。

体积排阻色谱（FPLC）：先用 FPLC Buffer 平衡色谱柱 Superdex 200，上样目的蛋白并洗脱，收集洗脱峰对应的蛋白，浓缩至 20 mg/mL 并于-80℃保存。

蛋白纯化缓冲液分别如下，Lysis buffer：25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5，100 mmol/L NaCl，5% glycerol；Equilibrate buffer：Lysis buffer with 5 mmol/L imidazole；Wash buffer： Lysis buffer with 20 mmol/L imidazole；Elution buffer：Lysis buffer with 350 mmol/L imidazole；FPLC Buffer：Lysis buffer with 2 mmol/L DTT。

1.2.2 哈氏弧菌（*Vibrio harveyi*）脂酰 ACP 合成酶的表达纯化

将质粒 pET-28a(+)-AasS 转化到大肠杆菌 *BL21* 中，挑取单菌落，接种于 100 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养液中，37 ℃振荡过夜培养。取 8 mL 过夜培养液接种于新鲜的 800 mL LB（含 50 mg/L 卡那霉素）中，37 ℃振荡培养至 OD_{600} 约为 0.5 后，添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 2.5 h，6500 rpm 离心 15 min 收集菌体，并将菌体保存在-20 ℃。目的蛋白纯化同 1.2.1。

1.2.3 acyl-ACP 合成及检测

采用高效液相色谱对 ACPs 进行分离分析[17]，色谱条件为：ODS-C_8 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（含 1‰三氯乙酸）；洗脱方式：梯度洗脱（表 2）；柱温：25℃；紫外检测器波长为 210 nm。

表 2 HPLC 流动相的梯度洗脱程序

Table 2 Gradient condition of mobile phase for HPLC

时间（min)	流量（mLmin^{-1})	乙腈（%)	水（1‰三氯乙酸）
0	1	35	65
15	1	55	45
16	1	35	65
20	1	35	65

Acyl-ACP 合成方法参考 Jiang[18]基础进行优化及设计。本文采用两种不同规模反应体系合成 acyl-ACP，如表 3。对照实验不加合成酶，其它条件与 acyl-ACP 合成体系相同。通过计算 acyl-ACP 峰面积（$A_{acyl\text{-}ACP}$）和对照实验中 *holo*-ACP 峰面积（$A_{holo\text{-}ACP}$）的比值得到产率。

表 3 Acyl-ACP 合成反应体系

Table 3 The synthesis systems of the acyl-ACP

合成体系中各成分	50 μL 合成体系各成分含量[a]	20 mL 合成体系各成分含量[b]
FA-Na (μM)	150	200
holo-ACP (μM)	50	75
$MgCl_2$ (mM)	10	10
Li_2SO_4 (mM)	10	10
ATP (mM)	5	10
DTT (mM)	2	2
Tris-HCl (mM)	25	25
温度（℃)	30	30
时间（h)	0.5	2

1.2.4 甘油-3-磷酸酰基转移酶的纯化及 acyl-ACP 的活性检测

缺刻缘绿藻甘油-3-磷酸酰基转移酶的表达纯化参考 Ouyang[19]所描述的方法进行。脂酰-ACP 的活性检测方法如下：100 μl 反应体系中含：甘油-3-磷酸 2 mM；acyl-ACP 0.2 mM；BSA 75 μM；甘油-3-磷酸酰基转移酶 100 μg，混匀后 30 ℃恒温 30 min。加入 500 μl 氯仿：甲醇（1:1，v/v）萃取，将下层有机相移出，氮气吹干后用 30 μl 氯仿重悬，薄层色谱法（TLC）分离后樱草黄显色以检测产物 LPA。TLC 展开剂为 5:4:0.8:5 的氯仿：甲醇：水：三乙胺。

2 结果和分析

2.1 建立 HPLC 方法分析不同 ACP 形式

对 ACP 的准确检测是 acyl-ACP 制备以及产率计算的依据。ACP 的形式包括 *holo*-ACP、*apo*-ACP 和 acyl-ACP 三种。*Apo*-ACP 是 *holo*-ACP 合成过程中未完成后修饰的前体。ACP 形式的检测方法包括含尿素的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法(UREA-PAGE) [20,21]、高效液相色谱法 (HPLC)[17]、质谱法 (MS)[13,22] 等。其中，MS 法分辨率高，定性和定量兼具，但是仪器价格昂贵；UREA-PAGE 法，设备简单，但操作繁琐、检测缓慢；HPLC 法检测快速、操作方便、结果准确，仪器普通，方法易实施。本文建立了 HPLC 法检测 ACPs (图 2）的方法，*holo*-ACP

和 *apo*-ACP 在 C8-ODS 柱上可有效检出，保留时间分别为 5.45 和 8.72，具有良好的分离效果。

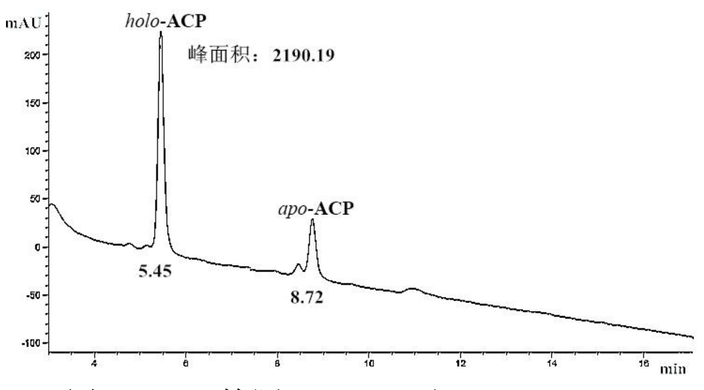


图 2 HPLC 检测 *apo*-ACP 和 *holo*-ACP

Fig2 HPLC analysis of *apo*- and *holo*-ACP

2.2 不同链长 acyl-ACP 的合成

哈氏弧菌 acyl-ACP 合成酶（VhAasS）催化合成不同链长 acyl-ACP 已有报道，但是 acyl-ACP 合成产率及纯度尚无明确研究。本文参照文献[23]的方法合成 acyl-ACP，通过 HPLC 法测定 acyl-ACP 保留时间及产率。结果表明：不同链长 acyl-ACP 在 C_8-ODS 柱上保留时间以及产率都不同（表 4）。4:0-ACP、6:0-ACP、8:0-ACP、10:0-ACP、12:0-ACP、14:0-ACP、16:0-ACP、18:1-ACP 的保留时间依次为 6.63、7.77、8.52、9.75、11.07、12.48、13.57、13.89 分钟，产率依次为 97.0%、93.4%、98.5%、90.0%、96.9%、90.2%、85.9%、25.7%。表明 VhAasS 偏好 C4-C14 链长的脂肪酸，而对长链脂肪酸 C16 和 C18 链长的脂肪酸活性较低。

表 4 不同链长 acyl-ACP 的保留时间及产率

Table 4 The retention time and yield of different chain length acyl-ACPs

acyl-ACP	保留时间（min）	$A_{holo\text{-}ACP}$	$A_{acyl\text{-}ACP}$	产率（%）
4:0-ACP	6.63	4567.56	4432.46	97.0
6:0-ACP	7.77	6015.08	5616.05	93.4
8:0-ACP	8.52	3513.82	3460.80	98.5
10:0-ACP	9.75	10421.6	9372.87	90.0
12:0-ACP	11.07	6816.42	6607.80	96.9
14:0-ACP	12.48	4073.94	3676.46	90.2
16:0-ACP	13.57	2201.83	1890.69	85.9
18:1-ACP	13.89	2201.83	565.83	25.7

Note: The yield is calculated by the ratio of $A_{acyl\text{-}ACP}$ to $A_{holo\text{-}ACP}$.

2.3 长链 acyl-ACP 合成体系优化

为高效获得长链 acyl-ACP，对长链 acyl-ACP 合成体系进行优化。长链 acyl-ACP 产率低的原因主要为 VhAaaS 对长链脂肪酸底物活性较低。

研究表明，低于 1% W/V 的 Triton-X100 可以提高 *E. Coli* AasS 的活性[11]，并且可以促进脂肪酸的溶解，但添加 0.5% W/V 的 Triton-X100 未提高 acyl-ACP 产率[表 5 (a)]，推测 Triton-X100 对 VhAasS 的活性影响不大。此外，离液序列

高的促溶盐（如盐酸胍，硫氰酸钾，LiCl 等）在一定程度上能够提高 AaaS 的活性[11]，但是离子浓度过高会抑制酶的活性[10]。经优化，加入 20 mM 的 Li^+，18:1-ACP 产率有明显提高[表 5 (b)]。优化后在 acyl-ACP 合成 50 μL 体系中 18:1-ACP 的产率提高到 88.8%，16:0-ACP 的产率达到 95.5%[表 5 (c)]。

表 5 不同反应条件下 acyl-ACP 的合成效率

Table 5 The synthetic efficiency of acyl-ACP in different reaction

	反应体系	保留时间（min）	$A_{holo\text{-}ACP}$	$A_{acyl\text{-}ACP}$	产率（%）
a	18:1-ACP, 0.5% Triton X-100,	14.61	2201.83	785.83	35.8
b	18:1-ACP, 10 mM Li_2SO4	13.89	2190.19	1943.85	88.8
c	16:0-ACP, 10 mM Li_2SO4	13.58	2190.19	2092.82	95.5

在此基础上，通过改变不同来源的 ACP 底物，优化 VhAaaS 催化制备 acyl-ACP 的反应效率。采用表 3a 反应体系对 *Sp6803* 来源 *holo*-ACP 进行反应，进而合成 *Sp6803* acyl-ACP，经 HPLC 分析测定 *Sp6803* ACPs 与 *E. coli* ACPs 在 C_8-ODS 柱上的保留时间不同，*holo*-ACP、*apo*-ACP 保留时间分别为 5.84 和 8.25，[图 3(a)]，以表 5b 反应体系进行 18:1-ACP 合成，反应后 18:1-ACP 的保留时间为 13.02，产率达 89.6%[图 3(b)]。结果表明，VhAaaS 对 *Sp6803 holo*-ACP 和 *E. Coli holo*-ACP 催化效率没有显著的差异，而 Li^+的加入对提高产率有很大的促进作用。

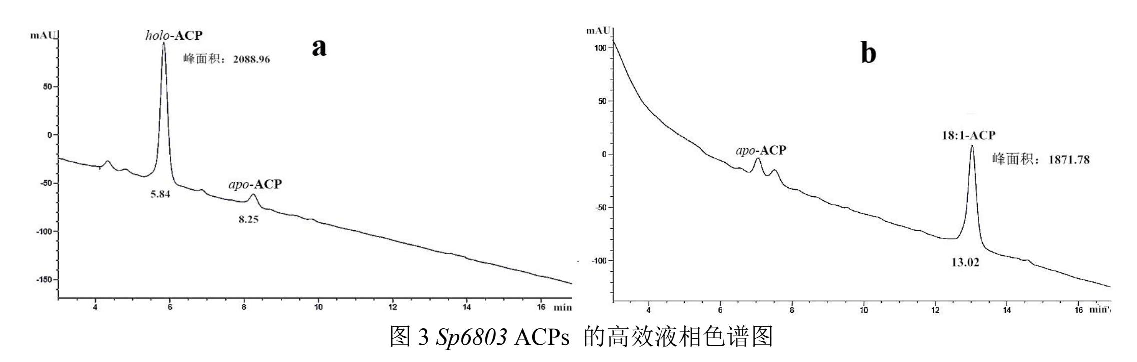


图 3 *Sp6803* ACPs 的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of *Sp6803* ACPs

(a) *holo*-ACP and *apo*-ACP; (b) 18:1-ACP

2.4 acyl-ACP 的规模化制备

扩大反应体系后，以 18:1 脂肪酸为底物，反应体系呈浑浊状态，18:1-ACP 的合成产率仅为 51.4%（表 6a）。因而反应体系的稳定性成为限制 acyl-ACP 合成的主要因素。因 ATP 分子具有助溶的生物学功能[24]，经优化和提高反应体系 ATP 的浓度至 10 mM 后，反应体系恢复至澄清均一状态，进而提高 acyl-ACP 产率，其它反应条件如表 3b，最终 18:1-ACP（表 6b）的产率达到 85.2%。

表 6 18:1-ACP 规模化合成的条件优化

Table 6 Optimization of 18:1-ACP synthesis in large-scale

	反应体系	保留时间（min）	$A_{holo\text{-}ACP}$	$A_{acyl\text{-}ACP}$	产率（%）
a	Table 1.2.3b with 5 mM ATP	14.61	9962.66	5123.59	51.4
b	Table 1.2.3b with 10 mM ATP	14.61	9962.66	8485.48	85.2

2.5 acyl-ACP 的应用

以 acyl-ACP 和甘油-3-磷酸为底物，在甘油-3-磷酸酰基转移酶（GPAT）的催化下，通过 TLC 方法，鉴定目的产物溶血磷脂酸（lysophosphatidic acid，LPA）的生成。

体外酶活性反应结果（图 4）表明，本研究合成的 acyl-ACP 可以作为 GPAT 的底物，将酰基转移至甘油-3-磷酸，生成 LPA。制备的 acyl-ACP 成功的用于 acyl-ACP 为底物的反应体系中，可以作为酰基的供体底物研究相关酶的催化机制。

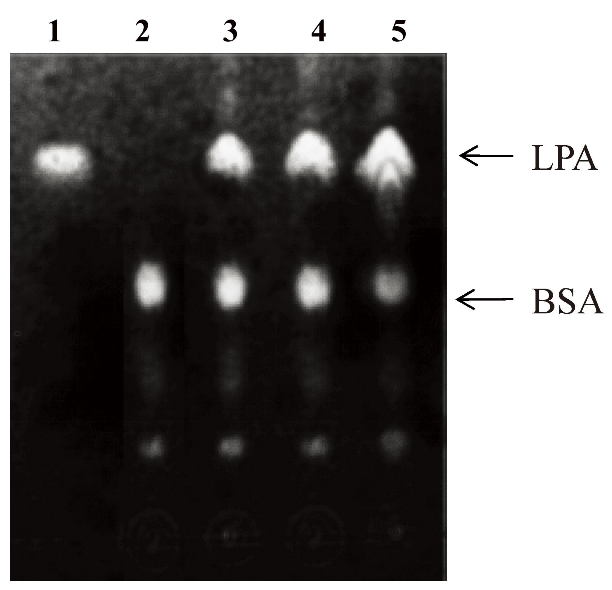


图 4 acyl-ACP 的生物活性检测

Fig.4 The bioactivity assays of acyl-ACPs with glycerol-3- phosphate acyltransferase *in vitro*. lane 1: standard LPA (17:0) ; lane 2: Negative control; lane 3: *E.coli* 16:0-ACP as substrate; lane 4: *E.coli* 18:1-ACP as substrate; lane 5: Sp6803 18:1-ACP as substrate;

3 讨论

采用 HPLC 法检测 ACPs，可以准确判断 acyl-ACP 的产率，是快速检测 ACPs 的一种有效手段。本研究结果表明 VhAasS 催化合成 acyl-ACP，偏好中长链脂肪酸（C6-C14），而对长链 acyl-ACP 的合成效率较低。针对长链底物转化效率较低的问题，提高 ATP 的浓度维持反应体系的溶解稳定性，引入锂离子增强酶的活性，从而实现高效稳定合成大量长链 acyl-ACP。推测 Li^{+}影响 VhAasS 在活性

部位分子的三维结构，进而改变酶的活性。目前，尚未有 AasS 的结构及 AasS 对底物链长选择机制的研究，所以酶活性增强和抑制机制还不清晰，仍然需要进一步研究。

参考文献

[1]. Magnuson K, Jackowski S, Rock CO, et al. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1993, 57(3):522-542.

[2]. Rock CO, Jackowski S. Regulation of Phospholipid Synthesis in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 1982, 257(18):10759-10765.

[3]. Katz L, Donadio S. Polyketide synthesis-prospects for hybrid antibiotics. Annu Rev Microbiol, 1993, 47(1):875-912.

[4]. Anderson MS, Raetz CRH. Biosynthesis of Lipid A Precursors in *Escherichia coli*. A membrane-bound enzyme that transfers a palmitoyl residue from a glycerophospholipid to lipid X. J Biol Chem, 1987, 262(11):5170-5179.

[5]. Parris KD, Lin L, Tam A, et al. Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis holo*-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. Structure, 2000, 8(8):883-895.

[6]. Mayo KH, Prestegard JH. Acyl Carrier Protein from *Escherichia coli*. Structural Characterization of Short-Chain Acylated Acyl Carrier Proteins by NMR. Biochemistry, 1985, 24(26):7834-7838.

[7]. Rock CO, Cronan JE. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. Biochem Biophys Acta, 1996, 1302(1): 1-16.

[8]. Sarria S, Kruyer N S, Peraltayahya P. Microbial synthesis of medium-chain chemicals from renewables. Nature Biotechnology, 2017, 35(12):1158-1158.

[9]. Cahoon EB, Lindqvist Y, Schneiider G, et al. Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(10):4872-4877.

[10]. Byers DM, Holmes CG. A soluble fatty acyl - acyl carrier protein synthetase from the bioluminescent bacterium *Vibrio harveyi*. Biochemistry and Cell Biology, 1990, 68(7-8):1045-1051.

[11]. Rock CO, Cronan JE. Solubilization, Purification, and Salt Activation of Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetase from *Escherichia coli*. J Biol Chem, 1979, 254(15):7116-7122.

[12]. Gangar A, Karande AA, Rajasekharan R. Purification and characterization of acyl-acyl carrier protein synthetase from *oleaginous* yeast and its role in triacylglycerol biosynthesis. Biochem J, 2001, 360(2):471-479.

[13]. Beld J, Finzel K, Burkart MD. Versatility of Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetases. Chemistry & Biology, 2014, 21(10):1293-1299.

[14]. Kaczmarzyk D, Fulda M. Fatty Acid Activation in Cyanobacteria Mediated by Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetase Enables Fatty Acid Recycling. Plant Physiology, 2010, 152(3):1598-1610.

[15]. Kuo TM, Ohlrogge JB. Acylation of plant acyl carrier proteins by acyl-acyl

carrier protein synthetase from *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys, 1984, 230(1):110-116.
[16]. Liu T, Vora H, Khosla C. Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in *E. coli*. Metab Eng, 2010, 12(4):378-386.
[17]. Jiang H, Zirkle R, Metz JG, et al. The Role of Tandem Acyl Carrier Protein Domains in Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis. J AM CHEM SOC, 2008, 130(20):6336–6337.
[18]. Jiang YF, Chan CH, Cronan JE. The Soluble Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetase of *Vibrio harveyi* B392 Is aMember of the Medium Chain Acyl-CoA Synthetase Family. Biochemistry, 2006, 45(33):10008-10019.
[19]. Ouyang LL, Li H, Yan XY, et al. Site-Directed Mutagenesis from Arg195 to His of a Microalgal Putatively Chloroplastidial Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Causes an increase in phospholipid Levels in Yeast. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(286).
[20]. Post-Beittenmiller D, Jaworski JG, Ohlrogge JB. In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach. Evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. J Biol Chem, 1991, 266(3):1858–1865.
[21]. Rock CO, Cronan JE, Armitage IM. Molecular Properties of Acyl Carrier Protein Derivatives. J Biol Chem, 1981, 256(6):2669-2674.
[22]. Bi H, Wang H, Cronan JE. FabQ, a Dual-Function Dehydratase / Isomerase, Circumvents the Last Step of the Classical Fatty Acid Synthesis Cycle. Chemistry & Biology, 2013, 20(9):1157–1167.
[23]. Lin S, Hanson RE, Cronan JE. Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway. Nat Chem Biol, 2010, 6(9):682-682.
[24]. Patel, A., Malinovska, L., Saha, S., et al. ATP as a biological hydrotrope. Science, 2017, 356(6339):753-756.

Large-Scale Synthesis Of Acyl-ACPs

DING Wei[1,2]*, FENG Yan-bin[1]*, CAO Xu-peng[1], XUE Song[1]**
1 Marine Bioengineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China
2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China
** Corresponding email: xuesong@dicp.ac.cn

Abstract:

Acyl-acyl carrier proteins (acyl-ACPs) are substrates for many biosynthesis pathways. However, acyl-ACP is substituted by acyl-CoA for studies *in vitro* as a result of supply restriction, which causes many questions in enzymatic analysis. Thus, obtaining large scale of acyl-ACP steadily is very important to study the related enzymes and metabolic pathways *in vitro*. Acyl-ACP synthetase catalyze the conversion of *holo*-ACP using fatty acid as acyl donor in vitro while no productivity has been reported before. Here an acyl-ACP synthetase from *Vibrio harveyi* was used

to catalyze the synthesis of (C4-C18) with *holo*-ACP, and the yield of acyl-ACP was confirmed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results indicated that the yields of medium chains (C4-C14) acyl-ACPs were more than 90.0% while the long chain yields of 16:0-ACP and 18:1-ACP were 85.9% and 25.7%, respectively. Via introducing Li^+ to the reaction system, the yield of long chain acyl-ACPs were elevated above 90.0%。Then the reaction parameters were optimized in the enlarged reaction system, and more than 20 mg acyl-ACPs were steadily obtained. Additionally, two species of *holo*-ACP were used to validate the versatility of the reaction system. Finally the acyl-ACP activity was conformed using a glycerol-3-phosphate acyltransferase. The synthesis of different chain acyl-ACPs are of great significance for research of the catalysis mechanism of related enzymes.

Keywords: acyl-ACP synthetase, acyl-ACP, HPLC